

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019694

International filing date: 22 December 2004 (22.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-434618
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 March 2005 (17.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26. 1. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 6 日
Date of Application:

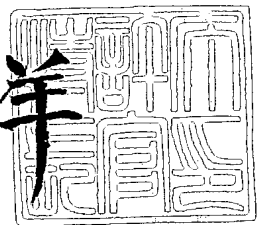
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 3 4 6 1 8
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 3 4 6 1 8]

出 願 人 大日本製薬株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 3 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 H15-31
【提出日】 平成15年12月26日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県八千代市大和田新田 5 9 - 5 6
 【氏名】 伊藤 幸治
【発明者】
 【住所又は居所】 愛知県西春日井郡師勝町大字久地野字権現 9 2 番地の 1
 【氏名】 早川 忍
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県明石市魚住町中尾 5 5 2 - 2 番 4 0 3 号
 【氏名】 舟岡 宏幸
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府寝屋川市東大利町 1 8 - 2 シティコート寝屋川 2 0 6
 【氏名】 細江 宏彰
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府豊中市浜 3 丁目 1 7 - 1 - 2 0 1
 【氏名】 西村 誠
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府泉南郡岬町淡輪 3 6 3 1 - 2 4
 【氏名】 大軽 靖彦
【発明者】
 【住所又は居所】 和歌山県和歌山市湊北町 1 丁目 4 1 番地
 【氏名】 薬王 郁久
【特許出願人】
 【識別番号】 000002912
 【氏名又は名称】 大日本製薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100099221
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 吉岡 拓之
 【電話番号】 06-6337-5931
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124637
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 松尾 まゆみ
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 058883
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9709795
 【包括委任状番号】 0307414

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

アレルゲンで感作されたモルモットの血液から分離され、S D S - P A G Eにより単一の主バンドを得るのに十分な純度をもつ本質的に精製された下記性状を有するモルモット免疫グロブリン E からなる画分；

- (1) 前記主バンドの分子量は約 2 0 0 k D a である、
- (2) 前記主バンドは還元性 S D S - P A G E により 2 つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約 7 0 k D a 及び約 3 0 k D a である、
- (3) モルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる、
- (4) モルモットにおける P C A 反応が陽性である、
- (5) 実質的にモルモット免疫グロブリン G を含有しない。

【請求項 2】

アレルゲンが卵白アルブミンである請求項 1 に記載のモルモット免疫グロブリン E からなる画分。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の免疫グロブリン E からなる画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体。

【請求項 4】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 3 に記載のモルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体。

【請求項 5】

請求項 3 又は 4 に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【請求項 6】

請求項 3 又は 4 に記載の抗体及び酵素標識された前記抗体を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【請求項 7】

免疫測定用試薬がサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法を実施するための試薬である請求項 5 又は 6 に記載のモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】モルモット免疫グロブリン E からなる画分及び抗体

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の性状を有する本質的に精製されたモルモット免疫グロブリン E（以下「IgE」ということもある）からなる画分に関する。また本発明は、前記画分をヒト以外の動物に免疫して製造されるモルモット IgE を特異的に認識することができる抗体（以下「抗モルモット IgE 抗体」ということもある）及び該抗体を含むモルモット IgE の免疫測定用試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

生体内に異物が侵入した場合、それを排除しようとして免疫反応が起こる。この免疫反応が過剰になった結果、生体に対して種々の病的症状をもたらす病態をアレルギーという。現在、乳幼児を中心としてアトピー性皮膚炎や喘息に代表される種々のアレルギー疾患患者が激増し、社会問題となっている。これらのアレルギー疾患の多くは、個々のアレルゲン（抗原）に対する IgE（抗体）が過剰に産生されることによって発症する I 型（即時型）アレルギーである。

【0003】

I 型アレルギーにおける IgE の産生調節メカニズムの解明や、アレルギーを抑制する薬物の研究・開発が進められている。IgE の関与が大きいこのような I 型アレルギーの実験現場では、例えば、受動皮膚アナフィラキシー反応（passive cutaneous anaphylaxis、以下「PCA 反応」という）に代表されるように実験動物としてモルモットが使用されることが多い。

【0004】

非特許文献 1 には、寄生虫を感染させたモルモットの血清から IgE が豊富に含まれる画分を分離して、該画分を抗原としてウサギに免疫して製造された抗モルモット IgE 抗体が記載されている。しかしながらここに記載されているモルモット IgE を豊富に含む画分は、他のクラスの免疫グロブリン、例えば免疫グロブリン G も相当量含んでいると考えられる。そのため、該画分を抗原として得られた抗体（抗血清）は、モルモット IgE に対する特異性が低く、そこから抗モルモット IgE 抗体を得るためには、抗血清を正常モルモット血清によって中和する必要があった。また、非特許文献 2 及び 3 にも非特許文献 1 と同様な画分及び抗体が記載されている。

【0005】

非特許文献 4 には、モルモット血液中の免疫グロブリン画分から、免疫グロブリンの各クラスを分離する方法が開示されている。そして、その図 8 にはクロマトグラフィーにより分離された各フラクションの SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法）による結果が示されているが、PCA 反応の活性を指標として IgE が含まれるとするフラクション 3 及び 4 の結果には、他のフラクションと区別できる固有の主バンドが形成されていない。これは、前記 2 つのフラクションには、その存在が SDS-PAGE では捉えられない極微量の IgE しか含まれていないためであると考えられる。

【0006】

仮にこのようなフラクションを抗原として使用したとしても特異性の高い抗モルモット IgE 抗体を製造することはできない。

【0007】

以上のとおり、これまで特異性に優れた抗モルモット IgE 抗体及び該抗体を製造するための純度の高い抗原、すなわち、高純度のモルモット IgE はこれまで製造されていなかったし、その性状も知られていなかった。

【非特許文献 1】“Int. Archs Allergy appl. Immun.”、1985 年、第 77 巻、p. 438-444

【非特許文献2】“Int Arch Allergy Appl Immunol”、1988年、第87巻、p. 424-429

【非特許文献3】“ANNALS OF ALLERGY”、1981年、第47巻、p. 52-56

【非特許文献4】“Journal of Immunological Methods”、1991年、第139巻、p. 123-134

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

前述のように、現在IgEが関与するアレルギーの実験系として、モルモットのPCA反応が実施されている。しかしながら、PCA反応はIgEそれ自体を定量的に測定するものではない。PCA反応においては、IgEと結合した肥満細胞が抗原により刺激され、放出されたケミカルメディエーター（ヒスタミン、ロイコトリエンなど）が血管に作用し、そこから漏出する色素量を測定することによって、アレルギー反応の程度を推測しているに過ぎない。

【0009】

このような状況において、アレルギーの実験現場においては、特異性の高い抗モルモットIgE抗体及び該抗体を含む精度の高いモルモットIgE測定用試薬の開発が望まれていた。

【0010】

本発明は、高度に精製されたモルモットIgEからなる画分、該画分を抗原として使用することによって製造される特異性に優れた抗モルモットIgE抗体及び、高い測定感度を有するとともに正確かつ簡便なモルモットIgEの免疫測定用試薬を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、アレルゲン、特に卵白アルブミン（ovalbumin、以下「OVA」という）で感作されたモルモットの血液から分離された免疫グロブリン画分よりIgEからなる画分を精製し、その性状を確認した。そして、この画分を抗原として使用することにより製造された抗モルモットIgE抗体がモルモットIgEを特異的に認識すること、さらには、この抗体を利用してIgEの免疫測定系を組み立てたところ高い感度で正確にモルモットのIgEが測定できることを見だし、本発明を完成した。

【0012】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

[1] アレルゲンで感作されたモルモットの血液から分離され、SDS-PAGEにより単一の主バンドを得るのに十分な純度をもつ本質的に精製された下記性状を有するモルモット免疫グロブリンEからなる画分；

(1) 前記主バンドの分子量は約200kDaである、

(2) 前記主バンドは還元性SDS-PAGEにより2つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約70kDa及び約30kDaである、

(3) モルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる、

(4) モルモットにおけるPCA反応が陽性である、

(5) 実質的にモルモット免疫グロブリンGを含有しない。

【0013】

[2] アレルゲンが卵白アルブミンである上記[1]に記載のモルモット免疫グロブリンEからなる画分。

【0014】

[3] 上記[1]又は[2]に記載の免疫グロブリンEからなる画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる

抗体。

【0015】

〔4〕抗体がモノクローナル抗体である上記〔3〕に記載のモルモット免疫グロブリンEを特異的に認識することができる抗体。

【0016】

〔5〕上記〔3〕又は〔4〕に記載の抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【0017】

〔6〕上記〔3〕又は〔4〕に記載の抗体及び酵素標識された前記抗体を含むモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【0018】

〔7〕免疫測定用試薬がサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法を実施するための試薬である上記〔5〕又は〔6〕に記載のモルモット免疫グロブリンEの免疫測定用試薬。

【発明の効果】

【0019】

上記本発明〔1〕によれば、抗モルモットIgE抗体を製造するための高度に精製された抗原を提供することができる。上記本発明〔3〕は、特異性に優れた抗モルモットIgE抗体を提供するものであり、それを含む上記本発明〔5〕によって、血液等の生体試料中のモルモットIgEを高感度で、正確かつ簡便に測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明は、アレルゲンで感作されたモルモット血液から分離され、特定の性状を有するモルモット免疫グロブリンEからなる画分（以下「モルモットIgE画分」という）に関する。

【0021】

本発明のモルモットIgE画分は、アレルゲンで感作されたモルモット血液の免疫グロブリン画分から精製されたものである。

【0022】

アレルゲンとしては、そのものでもってモルモットを感作した場合に、その血液中にIgEを過剰に産生せしめるものであれば、特に制限されずこの分野で公知の何れのものも使用することができる。このようなアレルゲンとして例えば、OVA、ダニ抗原、寄生虫、寄生虫抽出蛋白、ウマ血清などが挙げられるが、これらの中でも、入手や取り扱いが容易な点においてOVAが好ましい。

【0023】

感作は、常法、例えばアレルゲンをモルモット腹腔内に一定期間にわたって投与することにより行なうことができる。免疫グロブリン画分は、このようにしてアレルゲンによって感作されたモルモットの血液を採取し、飽和硫酸アンモニウム塩析法などの公知の処理をなすことにより製造することができる。

【0024】

このようにして得られるモルモットの免疫グロブリン画分より、それ自体公知の物理化学的手段を複数組み合わせることによって、本発明のモルモットIgE画分を製造することができる。

【0025】

例えば、免疫グロブリン画分中に大量に含まれる免疫グロブリンGを除去するためには、プロテインGカラムやDE52陰イオン交換樹脂を利用する方法がとられる。また、モルモットIgE画分の精製のためには、Q-SepharoseカラムクロマトグラフィーやMonoQカラムクロマトグラフィーなどの陰イオン交換処理、Superdex200カラムクロマトグラフィーなどのゲル濾過カラム処理などが行なわれる。なお、これらの物理化学的手段の各々は、必要に応じて、複数回繰り返し実施してもよい。

【0026】

上記各物理化学的手段においては、各手段に応じて通常使用される溶媒を特別な制限なく、適宜使用することができる。

【0027】

より具体的には、後記実施例に記載されている方法によって本発明のモルモット IgE 画分を製造することができる。

【0028】

かくして得られる本発明のモルモット IgE 画分が前記のような諸性状を有することは、後記実施例に示すとおりである。

【0029】

本発明のモルモット IgE 画分中に含まれる IgE の純度は高い方が、抗原として使用した場合に、より特異性の高い抗 IgE 抗体を得ることができる点において好ましい。

【0030】

また、本発明は、上記モルモット IgE 画分でもってヒト以外の動物を免疫して製造されるモルモット免疫グロブリン E を特異的に認識することができる抗体に関する。

【0031】

本発明の抗体は、モルモットの IgE を特異的に認識する抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れでもよいが、特異性及び均一性が高い点においてモノクローナル抗体の方が好ましい。

【0032】

ポリクローナル抗体は、本発明のモルモット IgE 画分を抗原として使用し、ヒト以外の動物を免疫することにより製造することができる。詳細には、前記のようにして得られたモルモット IgE 画分を適当なアジュバントと混合してウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ニワトリなどのヒト以外の動物に免疫し、血液を採取して公知の処理をなすことによって製造することができる。またモノクローナル抗体は、このように免疫された動物の脾臓細胞を採取し、ミルシュタインらの方法によりミエローマ細胞との細胞融合、抗体産生細胞スクリーニング及びクローニング等を行い、抗モルモット IgE 抗体を産生する細胞株を樹立し、これを培養することにより製造することができる。

【0033】

このようにして得られた抗モルモット IgE 抗体は、モルモットの IgE に対する特異性が極めて高く、他のクラスの免疫グロブリン、例えば、通常血液中において IgE よりもはるかに大量に存在するとされている免疫グロブリン G を認識しないものである。

【0034】

本発明の抗 IgE 抗体は、後述する本発明の免疫測定用試薬において好適に使用することができる。

【0035】

さらに本発明は、上記抗モルモット IgE 抗体を含むモルモット IgE の免疫測定用試薬に関する。

【0036】

本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬は、本発明の抗モルモット IgE 抗体の抗原に対する高い特異性に基づくものであり、種々の免疫測定法を実施するための試薬として有用である。ここにおける免疫測定法としては、抗原・抗体反応を含む測定法であればいずれでもよく、例えば、酵素免疫測定法（EIA法）、ラテックス凝集法、イムノクロマト法、放射免疫測定法（RIA法）、蛍光免疫測定法（FIA法）、ルミネッセンス免疫測定法、エバネッセンス波分析法などが挙げられる。これらの中でも、EIA法やラテックス凝集法を実施するための本発明の試薬が操作の容易性の観点からして好適である。

【0037】

本発明の免疫測定用試薬として EIA 法を実施するための試薬を選択した場合、EIA 法がモルモット IgE に存在する異なるエピトープを認識する 2 種類の抗モルモット IgE 抗体を用いたサンドイッチ酵素結合免疫固相測定法（サンドイッチ ELISA 法）であるのが好ましい。

【0038】

また、サンドイッチELISA法的一种としてアビジン-ビオチン反応を利用した方法もある。本法は、試料中のモルモットIgEを固相化抗モルモットIgE抗体でもって捕捉し、捕捉されたモルモットIgEとビオチンで標識した抗体との間で抗原抗体反応を行わせ、次に、酵素標識ストレプトアビジンを加えて、アビジン-ビオチン反応を行わせることを測定原理としている。

【0039】

このようなサンドイッチELISA法は、2種類の抗体を用いることから抗原に対する特異性が優れており、他のクラスの免疫グロブリンが混在する試料中のモルモットIgEを正確に測定することができる。

【0040】

本発明のサンドイッチELISA法を実施するための試薬は、固相化抗モルモットIgE抗体及び酵素またはビオチン標識抗モルモットIgE抗体から構成される。

【0041】

サンドイッチELISA法を実施するための試薬に含まれる2種類の抗モルモットIgE抗体は、モノクローナル抗体同士、ポリクローナル抗体同士又はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組合せの何れでも良い。

【0042】

固相化抗モルモットIgE抗体は、前述のようにして得られた抗体を、例えば、マイクロプレートウェルやプラスチックビーズなどの固相に結合させることにより製造することができる。固相への結合は通常、抗体をクエン酸緩衝液等の適当な緩衝液に溶解し、固相表面と抗体溶液を適当な時間（1～2日）接触させることにより行なうことができる。

【0043】

さらに、非特異的吸着や非特異的反応を抑制するために牛血清アルブミン（BSA）や牛ミルク蛋白等のリン酸緩衝溶液を固相と接触させ、抗体によってコートされなかった固相表面部分を前記BSAや牛ミルク蛋白等でブロッキングすることが一般に行なわれる。

【0044】

酵素標識抗モルモットIgE抗体は、上記固相化した抗体とは異なるエピトープを認識する抗モルモットIgE抗体と酵素とを結合（標識）させることにより製造することができる。該抗体を標識する酵素としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。これらの酵素と抗モルモットIgE抗体との結合はそれ自体公知の方法、例えば、グルタルアルデヒド法、マレイミド法などにより行なうことができる。

【0045】

また、ビオチン標識抗モルモットIgE抗体はビオチンと抗モルモットIgE抗体とを周知の方法により結合させることにより製造することができる。例えば、市販のビオチン標識化キットを使用して、ビオチンと抗モルモットIgE抗体とを結合させることができる。

【0046】

サンドイッチELISA法を実施するための本発明の試薬には上記抗モルモットIgE抗体以外に必要な応じて、標準物質、洗浄液、酵素活性測定用試薬（基質剤、基質溶解液、反応停止液等）などを構成試薬として含んでもよい。また、アビジン-ビオチン反応を利用した方法を実施するための本発明の試薬には、さらに酵素標識ストレプトアビジンを含んでもよい。

【0047】

所望により試薬に含まれる基質剤としては、選択した標識酵素に応じて適当なものが選ばれる。例えば、酵素としてパーオキシダーゼを選択した場合においては、 o -フェニレンジアミン（OPD）、テトラメチルベンチジン（TMB）などが使用され、アルカリホスファターゼを選択した場合においては、 p -ニトロフェニルホスフェート（PNPP）などが使用される。また、反応停止液、基質溶解液についても、選択した酵素に応じて、

従来公知のものを特に制限なく適宜使用することができる。

【0048】

本発明の別の好ましい形態である、ラテックス凝集法を実施するための試薬には、抗モルモット IgE 抗体はラテックス感作抗モルモット IgE 抗体の形で含まれる。ラテックス粒子と抗体との感作（結合）は、この分野で公知の方法、例えば、架橋剤としてカルボジイミドやグルタルアルデヒド等を利用する化学結合法や物理吸着法により成すことができる。

【0049】

ラテックス凝集法を実施するための試薬には、上記ラテックス感作抗モルモット免疫グロブリン抗体以外に、必要に応じて、希釈安定化緩衝液、標準物質などを含んでいてもよい。

【0050】

なお、本発明の別の実施形態である放射免疫測定法（RIA法）、蛍光免疫測定法（FIA法）、ルミネッセンス免疫測定法などを実施するための試薬も上記 EIA 法やラテックス凝集法を実施するための試薬に準じて常法に従い製造することができる。

【0051】

以上のようにして製造された、本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬は、免疫グロブリン E のみの特異的に測定できるものであり、他のクラスの免疫グロブリン、例えば、後記実施例に示すように免疫グロブリン G、免疫グロブリン M とは交差しない。

【実施例】

【0052】

以下に、実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。

【0053】

実施例 1；モルモット IgE 画分の製造

(1) アレルゲンの感作

10 μ g の OVA と 4mL の水酸化アルミニウムゲルを混和し、モルモット（Hartley 系、約 600g、雌）の腹腔内に投与した。その後直ちに、百日咳ワクチン（ 2.5×10^{10} 菌体/個体）を同様にして腹腔内に投与した（初回感作）。12 日後に 250mg/kg の用量でシクロフォスファミドを腹腔内投与（生理食塩水 4mL）した。その後、初回感作と同様な方法で 2 週間間隔で 8 回感作した。感作が完了した後、ジエチルエーテル麻酔下で開胸し、心臓より採血した。血液を遠心分離（3000rpm, 10min, 4℃）し、血清 35mL を回収した。

【0054】

(2) 免疫グロブリン画分の分離

上記 (1) により得られた血清を遠心分離（18,000rpm \times 15min）し、上清に等量の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）を加えた。この混合液と等量の飽和硫酸溶液を氷冷下にて攪拌しながら滴々添加し（50% 飽和硫酸）、添加後 20 分間攪拌した。次に遠心分離し（18,000rpm \times 30min）、得られた沈殿を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）に溶解し、10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）に対して透析し、免疫グロブリン画分液を得た。

。

【0055】

(3) モルモット IgE 画分の精製

上記 (2) において得られた免疫グロブリン画分液を遠心分離し（18,000rpm \times 30min）内溶液中の混濁物を除去後、陰イオン交換樹脂（DE52）を 100mL 充填し、10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で平衡化したカラムに展開した。10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）でカラムを洗浄後、次に 35mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で IgE を溶出させた。DE52 の IgE 溶出画分液を 50% 飽和硫酸とし 20 分間攪拌後、遠心分離した（18,000rpm \times 30min）。得られた沈殿を 20mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で溶解し、同様の緩衝液にて透析を行い、IgE 含有溶液を得た。硫酸精製後の IgE 含有溶液を 20mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で平衡化した Protein G カラム（Protein G Sepharose 4 Fast Flow [商品名]、カラムサイズ；1.6 \times 3cm、アマシャムバイオサイエンス社）に展開し

た(流速0.5 mL/分)。同緩衝液での素通り画分を分取した。再度Protein G カラムへ同条件にて展開し、素通り画分を回収し、10mM Na,K リン酸緩衝液pH7.5に対して透析した。

【0056】

Protein G処理後の透析内液をQ-Sepharose F.F. column (Q-Sepharose Fast Flow[商品名]、カラムサイズ; 1.6×8.5 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(Buffer A=10mM Na,K リン酸緩衝液pH7.5, Buffer B=0.3M Na,K リン酸緩衝液pH7.5, Flow=3mL/min, Fraction size=3mL, Gradient=0%B for 5min. 0-100%B in 90min)。後述するPCA反応試験によりIgE溶出画分を決定した。

【0057】

Q-Sepharose IgE溶出画分液を限外ろ過にて濃縮し、Superdex 200 column (Superdex 200 XK16/60 [商品名]、カラムサイズ; 1.6×60 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(流速; 1 mL/分、フラクションサイズ; 1 mL、溶出液; 50 mmol/L MES, 0.1 mol/L NaCl, pH6.5)。PCA反応試験によりIgE溶出画分を決定し、10mM Na,K リン酸緩衝液 pH7.5に対して透析した。

【0058】

Superdex 200 columnのIgE溶出画分をMono Q column (Mono Q HR5/5[商品名]、カラムサイズ; 0.5×5 cm、アマシャムバイオサイエンス社)に展開した(Starting buffer (buffer A): 0.01M Na,K phosphate buffer pH7.5, Gradient buffer (buffer B): 0.3 M Na,K phosphate buffer pH7.5, Gradient: sample チャージ後、0%B for 5min, 0-100% B in 30min、流速1.0 mL/min、UV range 0-0.2)。後述するPCA反応試験によりIgE溶出画分を決定し、モルモット IgE 画分を得た。

【0059】

(4) モルモット IgE 画分の諸性状

上記(3)で得られたモルモット IgE 画分の諸性状は以下のとおりであった。

【0060】

[1] SDS-PAGEにより単一の主バンドが得られ、その主バンドの分子量は約200 kDaである;

モルモット IgE 画分を非還元性試料用緩衝液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8、25%グリセロール、2% SDS及び0.01%ブロムフェノールブルー)に溶解し、100℃で3分間加熱後、SDS-PAGEを行った。アクリルアミド濃度が5~20%濃度勾配のゲル(E-T520L型、アトー社)で試料を分離した。電気泳動緩衝液として、62.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3、192mmol/Lグリシン、0.1% SDSを使用した。40mAで80分間電気泳動した後、ゲルを銀染色(銀染色キットワコー、和光純薬工業)した。分子量マーカーとして、HMW SDS マーカーキット(ミオシン[212,000Da]、 α_2 マクログロブリン[170,000Da]、 β ガラクトシダーゼ[116,000Da]、トランスフェリン[76,000Da]、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ[53,000Da]、アマシャムバイオサイエンス社)を使用した。

【0061】

図1に示すように、分子量約200 kDaのところに、単一の主バンドが認められた(レーン1; マーカー、レーン2; モルモット IgE 画分)。

【0062】

[2] 前記主バンドは還元性SDS-PAGEにより2つに分離され、分離後の各バンドの分子量は約70 kDa及び約30 kDaである;

モルモット IgE 画分を還元性試料用緩衝液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH6.8、350 mmol/L ジチオスレイトール、25%グリセロール、2% SDS及び0.01%ブロムフェノールブルー)に溶解し、100℃で3分間加熱後、SDS-PAGEを行った。アクリルアミド濃度が5~20%濃度勾配のゲル(E-T520L型、アトー社)で試料を分離した。電気泳動緩衝液として、62.5 mmol/L Tris-HCl pH8.3、192mmol/Lグリシン、0.1% SDSを用いた。40mAで80分間電気泳動した後、上記と同様にしてゲルを銀染色した。分子量マーカーとして、LMW マーカーキット(ホスホリラーゼ b [97,000Da]、アルブミン [66,000Da]、卵白アルブ

ミン [43,000Da]、カルボニックアンヒドラーゼ [30,000Da]、トリプシンインヒビター [20,100Da]、 α -ラクトアルブミン [14,400Da]、アマシヤムバイオサイエンス社)を使用した。

【0063】

図2に示すように、モルモット IgE 画分の還元性 SDS-PAGE により、上記[1]において認められた約 200 kDa の主バンドは認められず、約 70 kDa と約 30 kDa のバンドが認められた (レーン 1 ; マーカー、レーン 2 ; モルモット IgE 画分)。

【0064】

[3]モルモット IgE を特異的に認識することができる抗体を製造するための抗原として使用できる ;

この性状については、後記実施例 2 に記載されているとおりである。

【0065】

[4]モルモットにおける PCA 反応が陽性である ;

モルモット IgE 画分を生理食塩水を用いて、蛋白濃度が 31.3、62.5、125 および 250 ng/mL となるように希釈系列を調製した。モルモット (Hartley、雌、450~600 g) をエーテル麻酔し、背皮毛を刈り、皮膚に調製したモルモット IgE 画分を 0.1 mL ずつ皮内注射した。8 日間飼育後、前肢より、1 mg/mL OVA 及び 1 % エバンスブルーの生理食塩水液を 1 mL 注入し、30 分放置した。図 3 に示すように、屠殺後の皮膚裏側にはモルモット IgE 画分の蛋白濃度依存的に青斑が認められた。

【0066】

[5]実質的にモルモット免疫グロブリン G を含有しない ;

モルモット IgE 画分を精製する過程における Protein G カラムクロマトグラフィーにて、カラムに吸着した IgG を溶出し、モルモット IgG 画分とした。モルモット IgG 画分とモルモット IgE 画分を上記非還元性条件にて SDS-PAGE を行った (図 4 参照。レーン 1 ; マーカー、レーン 2 ; モルモット IgG 画分、レーン 3 ; モルモット IgE 画分)。

【0067】

ホライズプロット (アトー社) にてゲル中の分離された蛋白をニトロセルロース膜に転写した (131 mA で 1 時間)。転写後のニトロセルロース膜をブロッキング溶液 (2 % ブロックス [登録商標] 粉末) 中で室温にて 30 分間振盪した後、洗浄液 (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 0.05 % Tween [登録商標] -20, pH 7.5) 中で室温にて 10 分間振盪した。ヤギ抗モルモット IgG 抗体 (ケミコン社) をブロッキング溶液にて最終抗体濃度が 10 μ g/mL となるように希釈した。洗浄後のニトロセルロース膜を 10 μ g/mL に希釈したヤギ抗モルモット IgG 抗体で室温にて 1 時間振盪した。ニトロセルロース膜を洗浄液中で室温にて 5 分間振盪し、洗浄液を除去後、洗浄液を加えて再度室温にて 5 分間振盪した。洗浄後のニトロセルロース膜を、ブロッキング溶液にてホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識ブタ抗ヤギ IgG 抗体 (大日本製薬) を 2000 倍希釈した溶液中で室温にて 1 時間振盪した。洗浄液中で室温にて 5 分間の振盪を 2 回繰り返し、20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5 中で室温にて 5 分間振盪した。ニトロセルロース膜を Immun-blot assay kit (Bio-Rad 社) の試薬である Developer と室温にて 5 分間振盪し、発色反応を行い、蒸留水で洗浄し、反応を停止させた。

【0068】

図 4 に示すようにモルモット IgG 画分試料では分子量約 160 kDa 付近にモルモット IgG に関与する強い発色が認められた (レーン 4 ; モルモット IgG 画分)。一方、モルモット IgE 画分試料では分子量約 160 kDa 付近には発色が認められなかった (レーン 5 ; モルモット IgE 画分)。これらのことより、本発明のモルモット IgE 画分が実質的にモルモット IgG を含有しないことが示された。

【0069】

実施例 2 ; 抗モルモット IgE 抗体の製造

実施例 1 で得られた画分とアジュバント (Titer Max : シグマ社製) を等量混合後、超音波処理により乳化させ、実施例 1 で得られた画分 25 μ g/エマルジョン 0.5 mL/マウスと

なるよう調製した。この免疫抗原をマウス (BALB/c、4週齢) に2週間間隔で3回皮下及び皮下に投与した。3回目の免疫から1週間後に、マウスより脾臓細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞とPEG法にて細胞融合した。融合後、ハイブリドーマを96ウェルプレートに分注し、37℃の炭酸ガス培養器 (5% CO₂, 37℃) 中で1-2週間培養し、HAT 培地による選択を行った。モルモット IgE 画分を固相化したマイクロプレートを用いて、融合細胞の上清をELISA法により検出し、抗体の有無を確認した。陽性となったウェルに対しては、限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、モルモットIgEに対する反応性を有するクローンを選出した。得られたクローンの産生するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を BALB / cマウスの腹腔内で増殖させた後、その腹水中からプロテインGセファロースゲルを用いて精製した。

【0070】

実施例3；サンドイッチELISA試薬の製造

サンドイッチ ELISA 法によるモルモットIgEの測定用試薬を以下のように製造した。

(1) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗モルモットIgEモノクローナル抗体の調製

西洋ワサビペルオキシダーゼ4mgを蒸留水1mLに溶解し、その600 μ Lに0.1mol/L過ヨウ素酸ナトリウム溶液120 μ Lを加えて、室温で20分間反応させた。この溶液を1mmol/L酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.4) に対して一夜透析し、過ヨウ素酸酸化ペルオキシダーゼ溶液を得た。過ヨウ素酸酸化ペルオキシダーゼ溶液300 μ Lに、0.2mol/L炭酸緩衝液を15 μ L加えて、実施例2において製造したマウス抗モルモットIgEモノクローナル抗体(2mg/ml)を混合し、常温、遮光下で2時間インキュベーションした。その後、4mg/mL 水素化ホウ素ナトリウムを25 μ L加え、4℃で2時間放置した。50mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) に一晚透析した。

【0071】

(2) マウス抗モルモットIgE抗体の担体へのコーティング

実施例2において得られたマウス抗モルモットIgE抗体を抗体液用緩衝液 (5mmol/Lリン酸塩、0.9%NaCl pH7.0) に10 μ g/mLとなるように溶解した。これをマイクロタイタープレート (マイクロモジュールプレート、Maxsorp-F8、Nunc社) に200 μ Lずつ分注し、4℃で3晩放置した。

【0072】

(3) マイクロタイタープレートのブロッキング

各ウェルを300 μ Lのプレート洗浄液 (40mmol/Lリン酸塩、0.9%NaCl、0.1%防腐剤 [プロクリン150；ローム・アンド・ハース社] 0.1%ウシ血清アルブミン pH7.0) で3回洗浄後、保存用緩衝液 (0.1%プロクリン150、1%ブロックエース [登録商標] 粉末；大日本製薬) 300 μ Lを加え室温で2時間放置し、その後保存用緩衝液を除去した。

【0073】

(4) 標準物質の調製

前記と同様にして非還元性条件にて、モルモットIgE画分のSDS-PAGEを行い、ゲルをクマシーブリリアントブルー染色した。染色したゲルをデンスitomーター (島津二波長フライングスポットスキャニングデンスitomーター CS-9300PC) で計測した。約200kDaのモルモットIgE主バンドの染色強度の割合を求めた結果、79%であった。本画分をBCA protein assay kit (Pierce社) で蛋白定量し、その蛋白濃度に0.79を乗じた値を本画分中のモルモットIgE濃度とした。本画分をウシ胎児血清で希釈し、0, 25, 50, 100, 200, 400, 800ng/mLの標準溶液を調製した。

【0074】

実施例4；実施例3で製造した試薬によるモルモットIgEの測定

(1) 標準曲線の作成

マイクロタイタープレートの各ウェルに反応用緩衝液 (20mmol/L 2-モルホリノエタンスルホン酸-NaOH, 0.9%NaCl, 0.1% BSA, 0.2%プロクリン150) を100 μ L分注し

た。ここに、標準物質 (0, 50, 100, 200, 400, 800ng/mL) を同様に各ウェルに25 μ L加え、室温で1時間放置した。また、各ウェルを洗浄液300 μ Lで3回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗モルモットIgEモノクローナル抗体を希釈液で希釈し、100 μ Lずつ加え、室温で1時間放置した。次に、各ウェルを洗浄液300 μ Lで3回洗浄後、TMB溶液を100 μ Lずつ加え、室温遮光下で30分間反応させた。その後、3.2mol/L硫酸を100 μ Lずつ加え反応を停止させた。各ウェルの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて主波長450nm、副波長630nmで測定した。図5に標準モルモットIgE (800ng/ml)の希釈系列試料の測定結果を示した。この図は良好な標準曲線が得られたことを示している。

【0075】

(2) 試薬の基礎性能試験

(ア) 希釈試験

上記(1)の方法に従ってモルモット血清検体の希釈試験を行った。血清はIgE量の不明な血清3検体を検体希釈液でそれぞれ希釈系列を調製し、同時に測定した標準モルモットIgEから得られた標準曲線に基づいて、検体のIgE濃度を算出した。図6の結果に示すとおり、ほぼ原点を通る良好な希釈直線性が得られた。

(イ) 添加回収試験

上記(1)の方法に従ってモルモットIgEの添加回収試験を行った。血清検体3検体に標準モルモットIgEを添加し、測定値から添加したIgE量の回収率を求めた。下記【表1】に示すとおり、添加回収率は98.9%から109.7%と良好な結果が得られた。

【0076】

【表1】

検体	添加濃度 (ng/mL)	測定濃度 (ng/mL)	理論濃度 (ng/mL)	回収量 (ng/mL)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
A	0	74.7	74.7	—	—	98.9
	178.7	249.0	253.4	174.3	97.5	
	342.5	417.9	417.2	343.2	100.2	
B	0	82.6	82.6	—	—	109.7
	178.7	278.8	261.3	196.2	109.8	
	342.5	458.1	425.1	375.5	109.6	
C	0	66.1	66.1	—	—	99.1
	178.7	233.2	244.8	167.1	93.5	
	342.5	424.4	408.6	358.3	104.6	

(ウ) 同時再現性試験

上記(1)の方法に従って、同一のモルモット血清サンプルを8回測定して、同時再現性試験を実施した。その間の変動係数CV%は1.8%以下という良好な成績であった。

(エ) 交差反応性試験

上記(1)の方法に従って、精製モルモットIgGおよび精製モルモットIgM (Cortex社)を試料として測定した結果、下記【表2】に示すように、IgG及びIgMとはほとんど交差しなかった。よって、本測定系はモルモットIgGおよびモルモットIgMには交差反応しない測定系であり、モルモットIgEに特異的な測定系であることが示された。

【0077】

【表2】

モルモット イムノグロブリン	試料濃度 (μ g/mL)	測定値 (ng/mL)	交差反応率 (%)
IgE	0.8	800	100
IgG	1429	1.2	0.00008
IgM	900	0.3	0.00003

【0078】

これらの基礎性能試験の結果は、本発明の免疫測定試薬は非常に高い精度でモルモット IgE を測定することができることを示すものである。

【0079】

また、本発明の免疫測定用試薬は、わずか $25\mu\text{L}$ のモルモット血清中に存在する 6.2 ng/mL のモルモット IgE が検出可能であり、非常に感度が高いものであった。なお、本発明の免疫測定用試薬で正常モルモットの血液中 IgE 濃度を測定したところ、 $31.9\sim 97.6\text{ ng/mL}$ であった。

【産業上の利用可能性】

【0080】

本発明は、高度に精製されたモルモット IgE 画分、特異性に優れた抗モルモット IgE 抗体、及び該抗体を含むモルモット IgE を正確かつ簡便に測定可能な試薬を提供する。このような本発明により、アレルギーなどの動物実験の現場において、例えば、モルモット血液中の IgE 濃度を感度良く測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】本発明のモルモット IgE 画分の性状 [1] を表す SDS-PAGE による分析結果である。

【図2】本発明のモルモット IgE 画分の性状 [2] を表す還元性 SDS-PAGE による分析結果である。

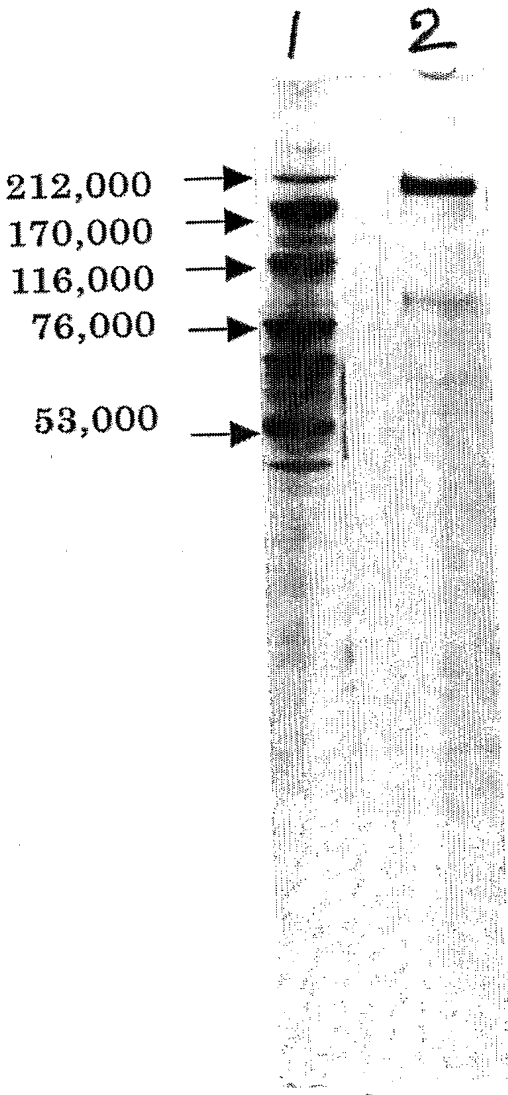
【図3】本発明のモルモット IgE 画分の性状 [4] を表すモルモット PCA 反応の実験結果である。

【図4】本発明のモルモット IgE 画分の性状 [5] を表すウェスタンブロッティングの分析結果である。

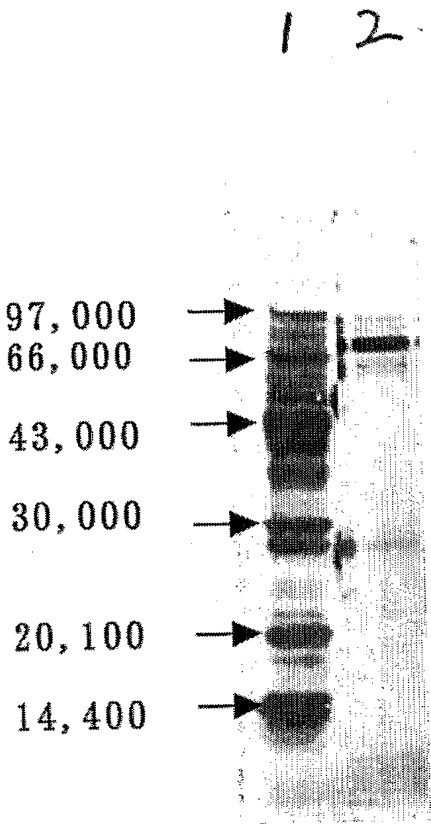
【図5】本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬を使用して作成した標準曲線である。

【図6】本発明のモルモット IgE の免疫測定用試薬の希釈試験（検体 1～3）の結果である。

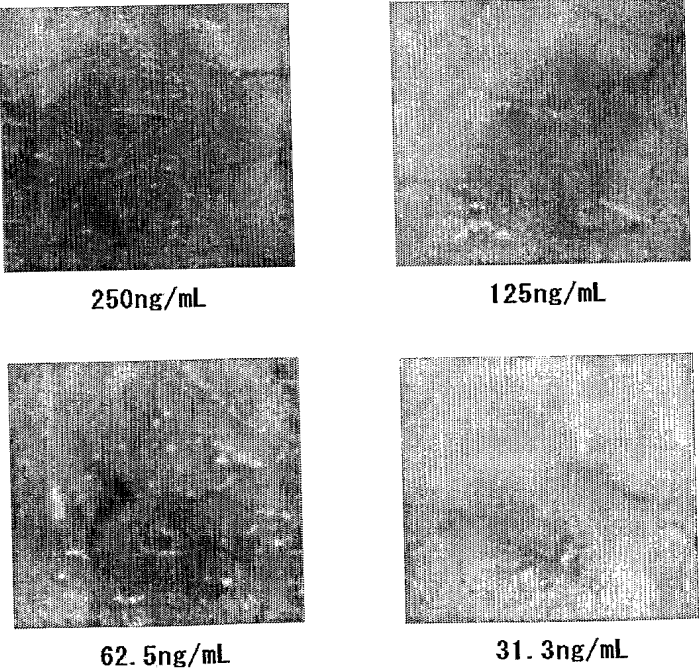
【書類名】 図面
【図 1】



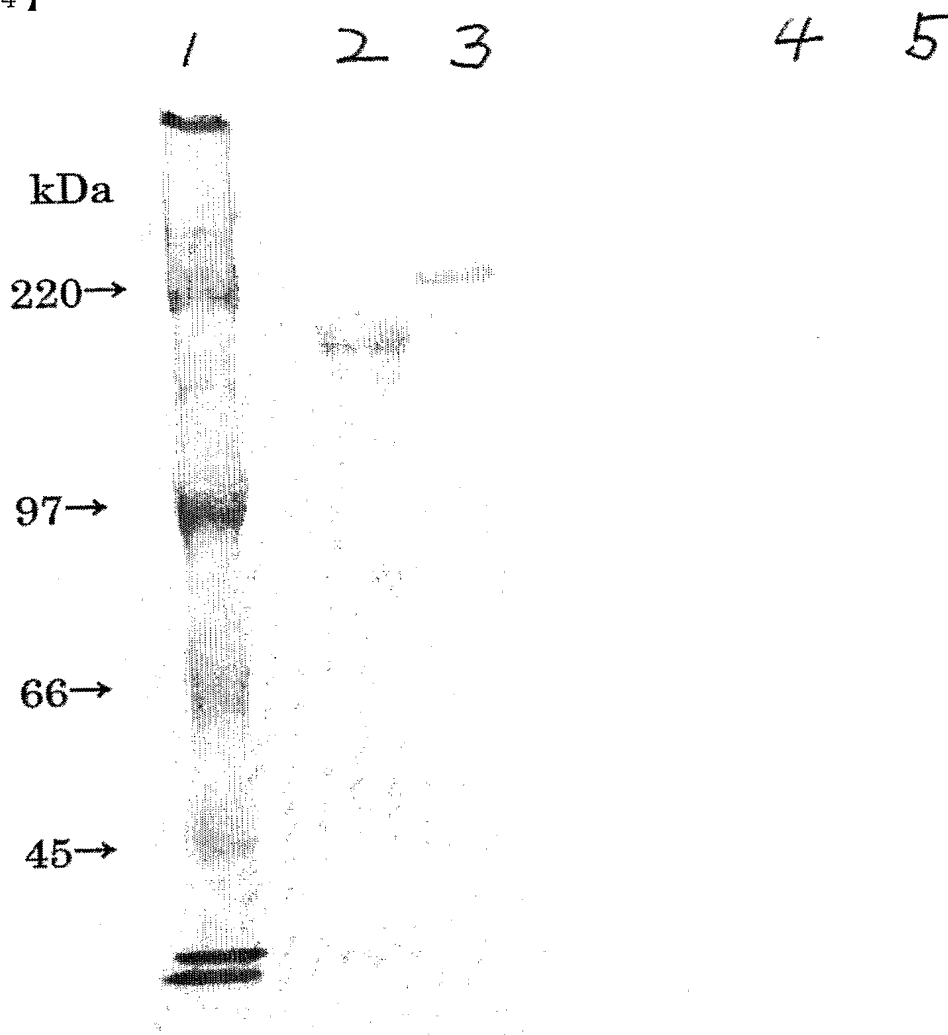
【図 2】



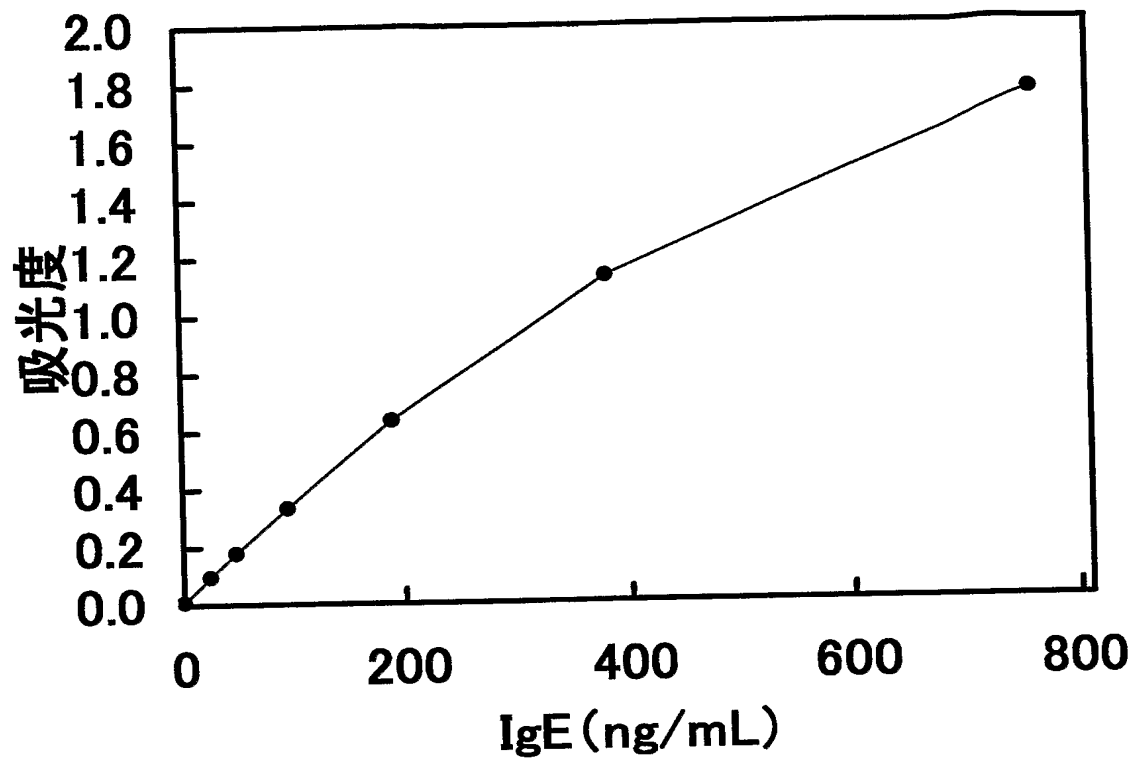
【図 3】



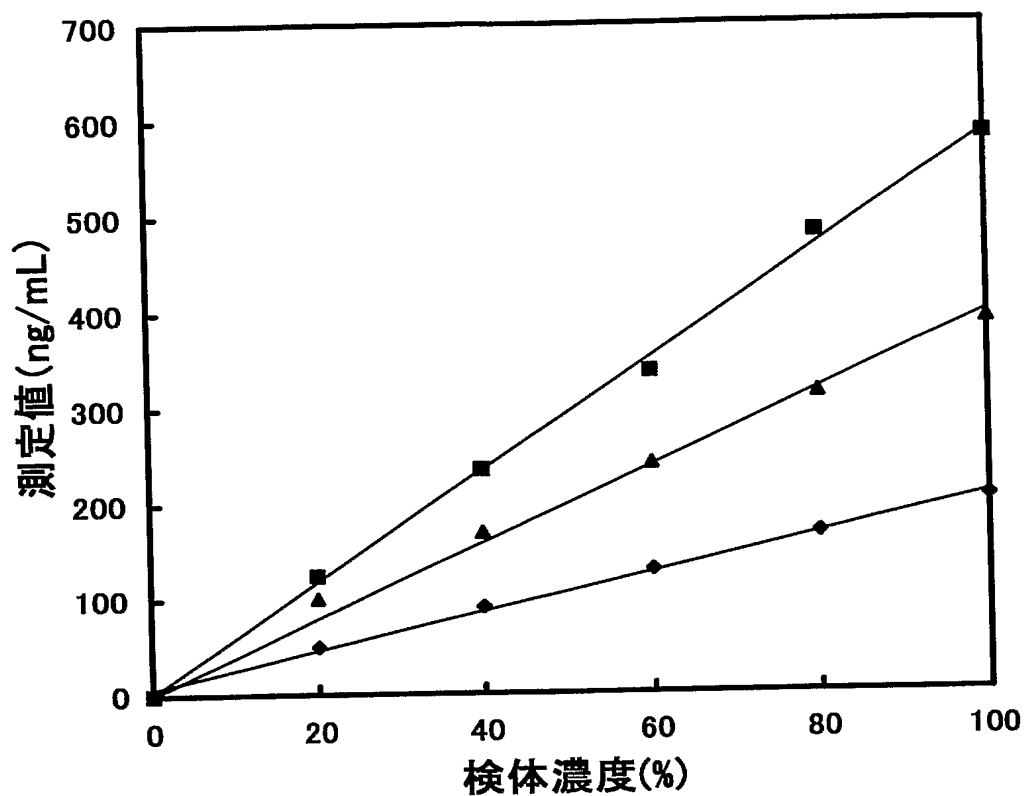
【図 4】



【図 5】



【図 6】



◆ 検体 1 ▲ 検体 2 ■ 検体 3

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 精製されたモルモット免疫グロブリン E 画分、該画分を抗原として得られた特異性の高い抗モルモット免疫グロブリン E 抗体、及び該抗体を含むモルモット免疫グロブリン E の免疫測定用試薬を提供すること。

【解決手段】 アレルゲンで感作されたモルモットの血液から免疫グロブリン画分を分離し、さらにこの画分を精製することにより、純度の高いモルモット免疫グロブリン E 画分を得ることができる。該画分を抗原として使用すれば、モルモットの免疫グロブリン E に特異的な抗体を製造することができ、さらに、該抗体を含む免疫測定試薬によってモルモットの免疫グロブリン E を高い精度で測定することができる。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 4 3 4 6 1 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 9 1 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 6 番 8 号

氏 名

大日本製薬株式会社